

( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: March 17, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 075384/2000

Applicant(s): HITACHI, LTD.

November 17, 2000

Commissioner,  
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2000-3096411

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re U.S. Patent Application of )  
KAMBARA et al. )  
Application Number: To be assigned )  
Filed: Concurrently herewith )  
For: DNA BASE SEQUENCING SYSTEM )

JC918 U.S. PTO  
09/805240  
03/14/01

Honorable Assistant Commissioner  
for Patents  
Washington, D.C. 20231

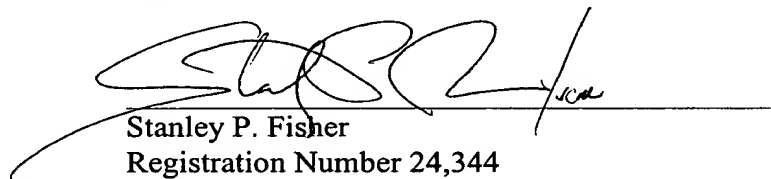
**REQUEST FOR PRIORITY  
UNDER 35 U.S.C. § 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of March 17, 2000, the filing date of the corresponding Japanese patent application 2000-075384.

The certified copy of corresponding Japanese patent application 2000-075384 is submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the attached certified copy is respectfully requested.

Respectfully submitted,

  
Stanley P. Fisher  
Registration Number 24,344

**REED SMITH HAZEL & THOMAS LLP**  
3110 Fairview Park Drive  
Suite 1400  
Falls Church, Virginia 22042  
(703) 641-4200  
March 14, 2001

**JUAN CARLOS A. MARQUEZ**  
Registration No. 34,072

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JCS18 U.S. PTO  
09/805240  
03/14/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2000年 3月17日

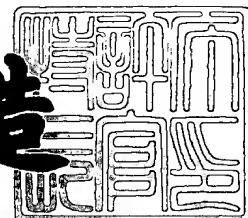
出 願 番 号  
Application Number: 特願2000-075384

出 願 人  
Applicant (s): 株式会社日立製作所

2000年11月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3096411

【書類名】 特許願

【整理番号】 H000107

【提出日】 平成12年 3月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所 中央研究所内

【氏名】 神原 秀記

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所 中央研究所内

【氏名】 周 国華

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地 株式会社日立製作所 ライフサイエンス推進事業部内

【氏名】 宮原 裕二

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【その他】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成 1 1 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構（再）委託研究、産

業活力再生特別措置法第 3 0 条の適用を受けるもの)

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNA塩基配列決定装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 鋳型DNAの相補鎖を合成する際にできるピロリン酸をATPに変換し、これをルシフェラーゼなどの酵素の存在下でルシフェリンに作用させ、得られる燐光を検出することで相補鎖合成をモニターし、DNA配列情報を得るDNA塩基配列決定方法において、4種のdNTPを、反応液と接し得るそれぞれ異なる毛細管あるいは細溝を通して加圧により反応部に供給する事を特徴とする上記方法。

【請求項 2】 各dNTP溜に順次圧力を加えることにより、各dNTPを予め定められた順序で反応部に供給することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 鋳型DNAの相補鎖を合成する際にできるピロリン酸をATPに変換し、これをルシフェラーゼなどの酵素の存在下でルシフェリンに作用させ、得られる燐光を検出することで相補鎖合成をモニターし、DNA配列情報を得るシステムにおいて、4種のdNTPを、反応部と接し得るそれぞれ異なる毛細管あるいは細溝を通して加圧あるいは送液システムにより反応部に供給する手段を有することを特徴とするシステム。

【請求項 4】 反応部と、dNTPを供給する毛細管あるいは細溝が1つのモジュールに組み込まれ、一体となっていることを特徴とする、請求項 3 に記載のシステム。

【請求項 5】 dNTPを供給する毛細管あるいは細溝を反応部の上部から反応液中に導入することができる構成であることを特徴とする、請求項 3 に記載のシステム。

【請求項 6】 断続的に繰り返して行う反応部へのdNTP供給の制御を、各dNTP溜への加圧の制御、あるいは加圧に加えてdNTP溜と反応部の間かけられる電界の制御により行うことを特徴とする、請求項 3 から 5 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 7】 少なくとも1つ以上の反応部と、4種のdNTPに対応して少なくとも4系統の試薬導入用毛細管を具備しており、反応部入り口の毛細管あるい

は細溝の内径が0.2mm以下であるか、および／または断面積が $0.04\text{mm}^2$ 以下であることを特徴とする、請求項3から6のいずれか一項に記載のシステムに用いる反応モジュール。

【請求項8】 少なくとも1つ以上の反応部と、4種のdNTPに対応して少なくとも4系統の試薬導入用毛細管を具備しており、反応部入り口の毛細管あるいは細溝の内径が0.1mm以下であるか、および／または断面積が $0.01\text{mm}^2$ 以下であることを特徴とする、請求項3から6のいずれか一項に記載のシステムに用いる反応モジュール。

【請求項9】 dNTPを含む反応試薬を、反応部下部から毛細管あるいは細溝を通して試薬溜から反応部へ導入することが可能な構造であることを特徴とする請求項7または8に記載の反応モジュール。

【請求項10】 dNTPを含む反応試薬供給ユニットと反応部ユニットが分離可能であり、反応部の上部に取り付けられた反応試薬供給ユニットから各反応試薬が交互に繰り返して各反応液中に毛細管あるいは細溝を通してそれぞれ供給されることを特徴とする請求項7または8に記載の反応モジュール。

【請求項11】 鋳型DNAの相補鎖を合成する際にできるピロリン酸をATPに変換し、これをルシフェラーゼなどの酵素の存在下でルシフェリンに作用させ、得られる燐光を検出することで相補鎖合成をモニターし、DNA配列情報を得るDNA配列決定方法において、相補鎖合成の開始地点を規定するプライマーを固体表面上に固定し、それにハイブリダイズしたDNAの相補鎖を合成する際にピロリン酸をATPに変換してルシフェリン、ルシフェラーゼなどと反応せしめ、得られる燐光を検出することでDNA塩基配列をモニターすることを特徴とする、上記方法。

【請求項12】 ターゲットDNAにハイブリダイズする複数種のプライマーをそれぞれ異なる固体表面あるいは固体表面の区画された異なるセルに固定し、ターゲットDNAをハイブリダイズさせた後、所定の反応をdNTPを用いて行い、それぞれの異なるプライマーに起因する相補鎖合成反応の結果放出される燐光を識別してモニターすることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 プライマーを、プライマーの種類ごとに空間的に分離され

たビーズの表面上にそれぞれ固定することを特徴とする請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 4】 プライマーを表面上に固定した固体が、プライマーの種類ごとに空間的に分離されたセル内に保持されていることを特徴とする、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 5】 請求項 1 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法に使用するシステム。

【請求項 1 6】 燐光の発光位置が識別可能な検出システムであることを特徴とする請求項 1 5 記載の DNA 解析システム。

【請求項 1 7】 燐光検出を冷却 CCD などのエリアセンサーによって行うことを特徴とする請求項 1 5 記載の DNA 解析システム。

【請求項 1 8】 燐光検出手段を、光電子増倍管あるいはアバランシエフォトダイオードなどの光検出デバイスと、反応部の位置を検出器に対して相対的に移動可能なシステムで構成したことを特徴とする請求項 1 5 記載の DNA 解析システム。

【請求項 1 9】 試薬の供給を反応部と非接触の方法で行うことができることを特徴とする請求項 1 5 記載のシステム。

【請求項 2 0】 複数の反応部の各反応部への試薬の供給を同時にインクジェット方式で行うことを特徴とする請求項 1 5 記載のシステム。

【請求項 2 1】 試薬の供給を反応部に通じる管径が 0.2mm 以下の毛細管を通して行うことを特徴とする請求項 1 5 記載のシステム。

【請求項 2 2】 相補鎖合成の鋳型となる DNA を固体表面上に固定し、それにハイブリダイズする相補鎖を合成する際に、ピロリン酸を ATP に変換してルシフェリン、ルシフェラーゼなどと反応せしめ、得られる燐光を検出することで DNA 塩基配列をモニターすることを特徴とするシステムにおいて、第一回目のプライマーを用いた配列決定操作後にプライマー及び相補鎖合成産物を除去し、新たにプライマー、酵素類を注入し、第二回目の DNA 配列解析を引き続き行う事のできる機能を有し、必要に応じてこのプロセスを繰り返し行う事のできる機能を具備する事を特徴とするシステム。

【請求項 2 3】 種々異なるターゲット DNA (DNA サンプル) をそれぞれ異な



る固体表面上あるいは区画された異なるセルに固定し、プライマーをハイブリダイズさせた後、所定の反応を酵素とdNTPを用いて行い、それぞれの異なる相補鎖合成反応の結果生成する燐光を識別してモニターする手段を具備することを特徴とする請求項22に記載のシステム。

【請求項24】 反応部と、4種のdNTPをそれぞれ保持する試薬溜と、該試薬溜から該反応部にdNTPを供給するための、少なくとも一部が毛細管または細溝からなる供給手段と、試薬の供給を制御する加圧手段と、反応部からの燐光を検出する検出手段と、検出されたデータを処理してDNA配列情報を得るデータ解析手段とを含むことを特徴とする、DNA塩基配列決定装置。

【請求項25】 請求項1、2、12のいずれか一項に記載の方法において、dNTPを加える際に、同じ種類を二度ずつ加えて、反応が十分進行したことを確認しながら配列決定する方法。

【請求項26】 請求項3～6、23のいずれか一項に記載のシステムにおいて、dNTPを加える際に、同じ種類を二度ずつ加えて、反応が十分進行したことを確認しながら配列決定するシステム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は遺伝子診断、遺伝子治療、遺伝子による種々物質の生産等に関連した遺伝子あるいはDNAの分析、解析に関する。特に、本発明はパイロシーケンシングの改良およびシステムに関し、DNA塩基配列決定方法あるいは配列モニター法、DNA塩基配列決定装置あるいは配列モニター装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

ゲノム解析計画の進展により、DNA配列を読みとり、病気の診断あるいは新しい有用物質の生産を遺伝子レベルで行おうとする動きが活発化してきた。そこでは大量のDNA試料を如何にして迅速に解析するかが大きな課題である。ゲノム解析により基本となるDNA塩基配列データは整いつつあるが、それらDNA配列、遺伝子の機能を調べるには、種々サンプルの配列を調べて、既に配列決定

した標準サンプルの配列と比較する必要がある。一度に配列決定するDNAの長さは短くてもよいが、大量の種々サンプルを迅速に配列決定し、配列の違いを見出し生物機能との相関を調べる事等が必要となる。

#### 【0003】

従来、DNA配列決定にはゲル電気泳動によるDNA塩基配列決定方法が用いられ、装置としてDNAシーケンサーが市販され広く用いられている。さらに最近では多くのDNAプローブを固体のセル上に固定してプローブアレーとしたDNAチップを用い、サンプルDNAとの間でハイブリダイズさせて迅速に配列を調べる方法が注目を集め始めている。

#### 【0004】

一方、上記の方法とは異なる配列決定法も提案されて、パイロシーケンシングと呼ばれている。パイロシーケンシングではDNAが相補鎖合成するとき反応産物として放出されるピロリン酸をATPに変え、ルシフェラーゼを用いてルシフェリンを光らせることでDNA相補鎖合成をモニターして配列決定する。パイロシーケンシングは、安価であり、迅速に大量のサンプルを同時に配列決定できるため、DNAの高スループットモニターとして有望な方法である。

#### 【0005】

報告されているパイロシーケンシングを簡単に要約する。用いる装置はいわゆる発光光度計である。サンプルDNA、相補鎖合成の起点を決定するプライマー、DNA合成酵素、反応基質として加えられ、未反応であったdNTPを分解する酵素アピラーゼ、ピロリン酸をATPに変換するスルフリラーゼ、ルシフェリン、ルシフェリンとATPの反応に関与するルシフェラーゼ等の試薬をタイタープレートにに入れる。この段階では合成反応の基質であるdNTPが存在しないので相補鎖合成はスタートしない。4種のdNTP(dATP、dCTP、dTTP、dGTP)をインクジェット方式により反応部の上部から順番に加える。相補鎖合成されるべき順番の塩基種がdCTPであるときには、dATP、dTTP、dGTPを加えても反応は起こらない。しかし、dCTPが添加されると反応がおり、相補鎖が1つ伸長してピロリン酸(PPi)が放出される。ピロリン酸はATPスルフリラーゼによりATPに変えられ、ルシフェラーゼの存在の

下でルシフェリンと反応して燐光を放出する。この燐光を二次電子増倍管等により検出する。余分な d C T P あるいは反応しなかった d N T P はアピラーゼにより分解され、以後に繰り返される d N T P 注入とそれによる反応には影響しない形に変えられる。4 種の d N T P は順番に繰り返し加えられ、そのときに発する燐光の有無により 1 つずつ配列を決定する。この一連の反応は図 3 に示される (Ronaghi, M. ら, Science 281, 363-365 (1998) 参照のこと)。

## 【 0 0 0 6 】

## 【発明が解決しようとする課題】

現状のパイロシーケンシングでは d N T P 注入にインクジェットノズルを用いており、インクジェットノズル等の制御部等を含めるとかなりの装置容積を必要とするという問題がある。また、試料となる目的 DNA は 1 本鎖状として反応部に入れる必要があり、試料調製に手間がかかるという問題がある。目的 DNA 以外に相補鎖合成する DNA が存在すると配列決定できない。配列決定可能な長さは報告されている限りでは 2 0 塩基 ~ 3 0 塩基である。これは配列決定がステップ反応によっているためであり、反応の収率が配列決定可能な塩基長に大きく影響する。

## 【 0 0 0 7 】

パイロシーケンシングを活用したシステムとして、手のひらサイズの DNA シーケンサー、遺伝子診断あるいは比較解析用大量解析用 DNA シーケンサー、あるいは DNA 変異分析システム等が考えられる。しかし、これらシステムの実現には、(1) いかに簡単で安価な小型装置を実現するか。(2) いかにして分析対象試料調製の手間を省き、かつ種々サンプルを同時に簡単に分析するか。(3) いかにして反応を均一に進め、反応収率をあげるか。等の種々の技術課題の解決が必要である。このような課題を克服した小型で安価な装置と、より簡便なサンプル調製を可能とし、必要に応じて長い塩基配列をも決定できるシステムの開発が望まれていた。

## 【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、小型で簡便な構成の DNA 塩基配列決定装置あるいは配列モニター装置を提供すること、試料調製が簡便にできる DNA 塩基配列決定方法あ

るいは配列モニター方法を提供することにある。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明では、反応セル（反応槽）と d N T P 供給路をマイクロ加工により形成しモジュール化し、加圧により簡単に d N T P の供給を可能とし、必要な装置あるいはシステムの物理的なサイズを低減可能とした。インクジェット等にかえて簡単な構成の試薬導入手段により、効率的な供給方法で必要十分量の d N T P を反応領域に試薬を注入できるので、小型、軽量、安価な装置が容易に実現できる。

【 0 0 1 0 】

さらに、種々プライマーを固体表面あるいはビーズ等に固定して 2 本鎖 DNA サンプルをプライマーにハイブリダイズすることでターゲットとなる DNA を取り出し、簡単にかつ必要十分な量だけ DNA サンプルを供給しうるようにした。1 本鎖にすることなく目的 DNA を反応部に注入するので、簡便な試料調製により配列決定反応ができる。

【 0 0 1 1 】

さらに、長い DNA の配列解析ができるよう、反応を十分進ませるために、反応槽を振動素子と接触させ、加えられた d N T P を反応液と十分混合するように反応部の構造を工夫した。注入された d N T P を攪拌することにより反応収率をあげることができる。

【 0 0 1 2 】

本発明の DNA 塩基配列決定方法、装置では、DNA 相補鎖合成するときに生成するピロリン酸を A T P に変換し、ルシフェラーゼを用いてルシフェリンを光らせ、発生した光を検出することにより、取り込まれた核酸の種類を知り塩基配列決定する。反応部に 4 種の d N T P を順次供給するが、これを毛細管あるいは細溝により試薬溜と反応部を連結して加圧して行なう。

本発明によれば、手のひらサイズの DNA 配列決定装置を作成でき、複数の反応槽を小さな領域に設けることにより、多種類 DNA の同時解析が可能となる。

【 0 0 1 3 】

すなわち本発明は、以下の（１）～（２６）を提供する。

（１） 鋳型DNAの相補鎖を合成する際にできるピロリン酸をATPに変換し、これをルシフェラーゼなどの酵素の存在下でルシフェリンに作用させ、得られる燐光を検出することで相補鎖合成をモニターし、DNA配列情報を得るDNA塩基配列決定方法において、４種のdNTPを、反応液と接し得るそれぞれ異なる毛細管あるいは細溝を通して加圧により反応部に供給する事を特徴とする上記方法。

【 0 0 1 4 】

（２） 各dNTP溜に順次圧力を加えることにより、各dNTPを予め定められた順序で反応部に供給することを特徴とする上記（１）に記載の方法。

（３） 鋳型DNAの相補鎖を合成する際にできるピロリン酸をATPに変換し、これをルシフェラーゼなどの酵素の存在下でルシフェリンに作用させ、得られる燐光を検出することで相補鎖合成をモニターし、DNA配列情報を得るシステムにおいて、４種のdNTPを、反応部と接し得るそれぞれ異なる毛細管あるいは細溝を通して加圧あるいは送液システムにより反応部に供給する手段を有することを特徴とするシステム。

【 0 0 1 5 】

（４） 反応部と、dNTPを供給する毛細管あるいは細溝が１つのモジュールに組み込まれ、一体となっていることを特徴とする、上記（３）に記載のシステム。

（５） dNTPを供給する毛細管あるいは細溝を反応部の上部から反応液中に導入することができる構成であることを特徴とする、上記（３）に記載のシステム。

（６） 断続的に繰り返して行う反応部へのdNTP供給の制御を、各dNTP溜への加圧の制御、あるいは加圧に加えてdNTP溜と反応部の間にかけられる電界の制御により行うことを特徴とする（３）から（５）のいずれかに記載のシステム。

【 0 0 1 6 】

（７） 少なくとも１つ以上の反応部と、４種のdNTPに対応して少なくとも４系統の試薬導入用毛細管を具備しており、反応部入り口の毛細管あるいは細溝の内径が0.2mm以下であるか、および／または断面積が $0.04\text{mm}^2$ 以下であることを特

徴とする、上記（３）から（６）のいずれかに記載のシステムに用いる反応モジュール。

【 0 0 1 7 】

（８） 少なくとも１つ以上の反応部と、４種のdNTPに対応して少なくとも４系統の試薬導入用毛細管を具備しており、反応部入り口の毛細管あるいは細溝の内径が0.1mm以下であるか、および／または断面積が $0.01\text{mm}^2$ 以下であることを特徴とする、上記（３）から（６）のいずれかに記載のシステムに用いる反応モジュール。

（９） dNTPを含む反応試薬を、反応部下部から毛細管あるいは細溝を通して試薬溜から反応部へ導入することが可能な構造であることを特徴とする上記（７）または（８）に記載の反応モジュール。

【 0 0 1 8 】

（１０） dNTPを含む反応試薬供給ユニットと反応部ユニットが分離可能であり、反応部の上部に取り付けられた反応試薬供給ユニットから各反応試薬が交互に繰り返して各反応液中に毛細管あるいは細溝を通してそれぞれ供給されることを特徴とする上記（７）または（８）に記載の反応モジュール。

【 0 0 1 9 】

（１１） 鋳型DNAの相補鎖を合成する際にできるピロリン酸をATPに変換し、これをルシフェラーゼなどの酵素の存在下でルシフェリンに作用させ、得られる燐光を検出することで相補鎖合成をモニターし、DNA配列情報を得るDNA配列決定方法において、相補鎖合成の開始地点を規定するプライマーを固体表面上に固定し、それにハイブリダイズしたDNAの相補鎖を合成する際にできるピロリン酸をATPに変換してルシフェリン、ルシフェラーゼなどと反応せしめ、得られる燐光を検出することでDNA塩基配列をモニターすることを特徴とする、上記方法。

【 0 0 2 0 】

（１２） ターゲットDNAにハイブリダイズする複数種のプライマーをそれぞれ異なる固体表面あるいは固体表面の区画された異なるセルに固定し、ターゲットDNAをハイブリダイズさせた後、所定の反応をdNTPを用いて行い、それぞれの異なるプライマーに起因する相補鎖合成反応の結果放出される燐光を識別してモ

ニターすることを特徴とする上記（１１）記載の方法。

【 0 0 2 1 】

（１３） プライマーを、プライマーの種類ごとに空間的に分離されたビーズの表面上にそれぞれ固定することを特徴とする上記（１１）記載の方法。

（１４） プライマーを表面上に固定した固体が、プライマーの種類ごとに空間的に分離されたセル内に保持されていることを特徴とする、上記（１１）記載の方法。

（１５） 上記（１１）～（１４）のいずれかに記載の方法に使用するシステム。

【 0 0 2 2 】

（１６） 燐光の発光位置が識別可能な検出システムであることを特徴とする上記（１５）記載のDNA解析システム。

（１７） 燐光検出を冷却CCDなどのエリアセンサーによって行うことを特徴とする上記（１５）記載のDNA解析システム。

（１８） 燐光検出手段を、光電子増倍管あるいはアバランシェフォトダイオードなどの光検出デバイスと、反応部の位置を検出器に対して相対的に移動可能なシステムで構成したことを特徴とする上記（１５）記載のDNA解析システム。

【 0 0 2 3 】

（１９） 試薬の供給を反応部と非接触の方法で行うことができることを特徴とする上記（１５）記載のシステム。

（２０） 複数の反応部の各反応部への試薬の供給を同時にインクジェット方式で行うことを特徴とする上記（１５）記載のシステム。

（２１） 試薬の供給を反応部に通じる管径が0.2mm以下の毛細管を通して行うことを特徴とする上記（１５）記載のシステム。

【 0 0 2 4 】

（２２） 相補鎖合成の鋳型となるDNAを固体表面上に固定し、それにハイブリダイズする相補鎖を合成する際にピロリン酸をATPに変換してルシフェリン、ルシフェラーゼなどと反応せしめ、得られる燐光を検出することでDNA塩基配列をモニターすることを特徴とするシステムにおいて、第一回目のプライマー

を用いた配列決定操作後にプライマー及び相補鎖合成産物を除去し、新たにプライマー、酵素類を注入し、第二回目のDNA配列解析を引き続き行う事のできる機能を有し、必要に応じてこのプロセスを繰り返し行う事のできる機能を具備する事を特徴とするシステム。

## 【 0 0 2 5 】

( 2 3 ) 種々異なるターゲットDNA ( DNAサンプル ) をそれぞれ異なる固体表面上あるいは区画された異なるセルに固定し、プライマーをハイブリダイズさせた後、所定の反応を酵素とdNTPを用いて行い、それぞれの異なる相補鎖合成反応の結果生成する燐光を識別してモニターする手段を具備することを特徴とする上記 ( 2 2 ) に記載のシステム。

( 2 4 ) 反応部と、4種のdNTPをそれぞれ保持する試薬溜と、該試薬溜から該反応部にdNTPを供給するための、少なくとも一部が毛細管または細溝からなる供給手段と、試薬の供給を制御する加圧手段と、反応部からの燐光を検出する検出手段と、検出されたデータを処理してDNA配列情報を得るデータ解析手段とを含むことを特徴とする、DNA塩基配列決定装置。

## 【 0 0 2 6 】

( 2 5 ) 上記 ( 1 ) 、 ( 2 ) 及び ( 1 2 ) のいずれかに記載の方法において、d N T Pを加える際に、同じ種類を二度ずつ加えて、反応が十分進行したことを確認しながら配列決定する方法。

( 2 6 ) 上記 ( 3 ) ～ ( 6 ) 及び ( 2 3 ) のいずれかに記載のシステムにおいて、d N T Pを加える際に、同じ種類を二度ずつ加えて、反応が十分進行したことを確認しながら配列決定するシステム。

## 【 0 0 2 7 】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明の詳細を実施例に従い、図を用いて説明する。

## (実施例 1)

図 1 は、本発明の実施例 1 の構成例を示す図であり、1つの反応部とd N T P試薬溜を持つパイロシーケンシングデバイス ( DNA塩基配列決定装置 ) の構成例を示す図である。反応モジュールは、デバイス基板 5 に形成された反応槽 ( 反



応部) 10と4種のdNTPをそれぞれ保持する試薬溜1、2、3、4とからなっている。反応槽10と各溜は試料導入用キャピラリー(毛細管)12で結ばれており、各試薬溜から反応に用いるdNTPが反応部に供給される。dNTPの運搬は試薬溜の液面を加圧して反応槽10に流入させるが、反応液の逆流等を押さえたり、液面の少しの差で試薬が他方に流れることを防止する必要がある。そこで各キャピラリーの内径は0.1mm以下、あるいは断面積を0.01mm<sup>2</sup>以下とした。この例では反応槽10と試薬溜1~4をガラス製のキャピラリー12でつないだが、微細加工を用いた細溝を試薬導入管として用いてもよい。

## 【0028】

図2は、本発明の実施例1の他の構成例を示す図であり、複数の反応部を持ち、外部に設けられた試薬溜と複数の反応部を配管で結合したパイロシーケンシングデバイス(DNA塩基配列決定装置)の反応モジュールの構成例を示す図である。図2は、複数の反応部(反応槽)10と試薬導入用細管6が一体にデバイス基板5に形成された反応モジュールの例を示す。試薬はこの反応モジュールと分離された試薬溜1、2、3、4に保持され、試薬導入用細管6を通して各反応槽10に導入される。試薬導入用細管6の各反応槽10に接する各2cmの領域が約0.1mm内径の細い毛細管(キャピラリー)で構成されており、ここを通過する液体抵抗が注入スピードを決める。

## 【0029】

図1、図2に示す反応モジュールは、図5~図10に示す反応モジュールと同様に、暗箱等の内部にセットされ、外部の光から遮光されている。図1、図2に示す反応モジュールの反応部の上部あるいは下部は透明部材で構成されており、発光はこの窓を通して検出器7に導かれる。窓に接して、もしくはレンズで集光し、または光ファイバー等でガイドして光電子増倍管で検出したり、冷却CCD等のエリアセンサーで検出する。検出可能な光の量を多くするために、受光する側と反対側に平面あるいは凹面の反射鏡を設置するのも有効である。

## 【0030】

反応モジュールの反応槽10内に鋳型DNA、DNAポリメラーゼ、ATPスルフリラーゼ、アピラーゼ、ルシフェリン、ルシフェラーゼ等の試薬を注入する

。一方、4つの反応試薬溜1、2、3、4にはバッファー液とそれぞれdATP、dCTP、dGTP、およびdTTPを注入する。反応部10と各試薬溜1～4を結ぶ毛細管には反応液が満たされるが、動作上支障はない。また、この毛細管を疎水性のもので構成し、最初は液が毛細管内に入らないようにしてもよい。この場合、毛細管には空気が入っており、液体の流動は反応操作を開始するまではない。いずれの場合も、反応に際してはdNTPを反応部に加圧注入するので実用上問題はない。試薬を所定の反応槽に注入して4種の試薬溜を順次加圧し、4種のdNTPを一定の順序で反応槽に導入して相補鎖合成を行う。相補鎖に取り込まれるべき塩基がAの場合にdATPを加えると相補鎖が1つ伸張し、反応産物としてピロリン酸が放出される。これはATPスルフィラーゼによりATPに変換され、ルシフェラーゼの働きでルシフェリンと作用し光を発する。

## 【0031】

図3は、本発明の実施例1のパイロシーケンシングで行われる一連の反応を示す図である。過剰のdATPはアピラーゼにより分解されるので、試薬注入直後に光り、信号が増大し直ちに減衰する。すなわち、時間変化をみているとピーク状の光信号が得られる。一方、相補鎖に取り込まれるべき塩基種と異なるdNTPが注入された場合には反応は起こらないので光はでない。このようにdNTPの種類を変化させながら相補鎖合成を一步一步行っていく過程で発光が見られるか否かでDNA塩基配列を決定する。反応が不十分な場合には、それぞれのDNA鎖で反応の進行が不揃いとなり、塩基配列決定に支障を来す。

## 【0032】

そこで反応を均一にするために反応モジュールを振動させるデバイスが取り付けられている。例えば、図7に示すように、周波数20kHzの振動子32が使用できるが、特に限定されるものではなく、また反応液を攪拌できればデバイスを振動させないものでもよい。また、同じdNTPを2回ずつ加えて反応の進行が十分であることを確認しながら行っても良い。

## 【0033】

図1、図2に示す反応モジュールの反応部で発生した発光は光電子増倍管7等で受光された後、電流・電圧増幅器8、AD変換器等を経て計算機（データ処理

器) 9 に導入されデータ処理され、塩基配列決定結果が出力される。

図 4 は、本発明の実施例 1 の構成により実験で得られる発光信号の一例を示し、縦軸は発光強度、横軸は時間を示す図である。

#### 【 0 0 3 4 】

dNTP 試薬は dATP、dCTP、dTTP、dGTP の順序で繰り返し反応部に注入される。それに応じて光がでるが、相補鎖合成がおこったときには強い光が出る。相補鎖合成が起こらないと本来 Ppi ができず光はでないが、試薬中に含まれる不純物などのためにわずかに光が出る。大きな光信号を発する場合に注入された dNTP の種類を記録していくことで配列決定ができる。同じ塩基種がつながっており、続けて同じ塩基が取り込まれるときには生成する Ppi の量が増加する。2 個とり込まれるときには約二倍の、3 個取り込まれるときには約 3 倍の強度の光が出る。このような相補鎖合成反応は 1 0 0 % 行われるわけではなく、反応が進むと未反応の DNA 鎖も増えてきて本来光が出ない dNTP 添加のときでも光が観測されるようになる。これによって配列決定できる DNA の長さ限界がほぼ決まる。図では 5 0 塩基以上の配列決定が可能な例を示している。

#### 【 0 0 3 5 】

##### (実施例 2)

図 5 は、本発明の実施例 2 の構成例を示す図であり、反応部に上部からキャピラリーで d N T P を注入するタイプのパイロシーケンシングデバイス (DNA 塩基配列決定装置) の構成例を示す図である。実施例 2 では試薬注入を反応槽 1 0 の上部から行う。実施例 2 の反応モジュールは、デバイス基板 5 に形成された反応部 (反応槽) 1 0 と、デバイス基板 5 と分離可能なふた (試薬供給ユニット) 1 1 から構成される。反応槽 1 0 の上部から試薬導入用細管 6 と試薬導入用毛细管 (キャピラリー) 1 2 を具備したふた 1 1 が覆い被さる。反応槽 1 0 に接するキャピラリー 1 2 の部分は実施例 1 よりも長くなるので、キャピラリーの内径を 0. 2 mm とした。内径 0. 2 mm のキャピラリーを通過する液体抵抗が注入スピードを決める。反応槽 1 0 とふた 1 1 は密閉構造とすることができ、実施例 1 と同様にして加圧により試薬を試薬溜 1、2、3、4 から反応槽 1 0 に供給する。加圧はポンプを用いたが、別の方法として各試薬溜 1 ~ 4 と反応槽 1 0 との落

差を用いてもよい。落差を用いる場合には、4種の試料溜1～4の高さを交互に変化させる必要がある。また、落差を一定に保ち電解によるオスミックフローを活用して、電界で試料の注入をコントロールしてもよい。また、マイクロシステムで用いられる送液ポンプを活用しても良い。反応槽10と各試料溜1～4の間に1kV～2kVの電圧をかけ、反応槽10から試料溜1～4にオスミックフローを生成する。このオスミックフローは落差による液流と逆方向でありほぼバランスする。電界の向きを逆転させ、落差とオスミックフローの流れを一致させると試料が反応槽へ供給される。このようなサンプル供給を反応部の上部のふた部分に設けられた毛細管を通して行う方式は、配列決定しようとするDNA試料の種類が多い場合に有効である。

## 【0036】

図6は、本発明の実施例2の他の構成例を示す図であり、複数の反応部をもち、外部に配置された試薬溜のdNTPを配管を通して上部からキャピラリーにより順番に注入するタイプのデバイス（反応モジュール）の構成例を示す図である。図6に示す構成例は、多数の反応容器（反応セル）を持ったマイクロタイタープレート5の反応セルを反応槽10として用いた例である。上部のふた11はマイクロタイタープレートの上面に密着され、反応部（反応槽、反応セル）10を密封する事ができる。ふた11には試料導入用キャピラリー12が各反応セル10について4本設けられており、各反応セルに各dNTPを供給する。試料導入用キャピラリー12はそれぞれ太い試料導入用細管6を介して試料溜1、2、3、4につながっている。試料溜に圧力を加えると各キャピラリー12から反応槽10に試薬が供給される。以下の反応は前述した通りである。

## 【0037】

## （実施例3）

図7は、本発明の実施例3の構成例を示す図であり、複数の反応部と複数の試薬溜を持ち、マイクロ加工等により作製した細管を用いて試薬を反応部に供給する構造としたDNA配列決定装置の接合型反応モジュールの構成例を示す図である。

## 【0038】

図 7 に示す接合型反応モジュールの例では、反応試薬を反応槽 1 0 の下部から供給する。接合型反応モジュールは、反応槽 1 0 を構成する複数の穴が形成された接合型反応モジュールの上部板 1 4 と、複数の試薬溜 1、2、3、4、1'、2'、3'、4' および試薬導入用キャピラリー（細溝）1 3 が形成された接合型反応モジュールの下部板 1 5 とが接合されて形成され、上部板 1 4 と下部板 1 5 の接合により複数の反応槽 1 0 が形成される。試薬溜 1 と試薬溜 1'、試薬溜 2 と試薬溜 2'、試薬溜 3 と試薬溜 3'、試薬溜 4 と試薬溜 4' は、それぞれ試薬導入用細管 6 により結ばれており、試薬導入用細管 6 と各反応槽 1 0 とが細溝 1 3 により結ばれる。反応槽 1 0 の下部に形成される細溝 1 3 から d N T P が供給される。

## 【 0 0 3 9 】

実施例 3 の反応モジュールの構成では、洗浄も容易であり繰り返し使用もできる。4 種の d N T P はそれぞれ独立の試薬溜 1、2、3、4 に保持され、加圧により反応部 1 0 へ順番に供給される。図 7 に示す構成では、試薬溜を 1 つの d N T P あたり 2 個設けたが、これは反応液を送る試薬導入用細管 6 中に気泡等が入った場合に、試薬溜を片方から加圧して気泡を反対側へ押し流すためである。この試薬導入用細管 6 と反応部 1 0 はキャピラリー 1 3 で結ばれているがキャピラリーの内径は試料導入用細管 6 より細く、試薬溜の加圧時の圧力損失はほぼキャピラリー 1 3 の部分でおこる。DNA 相補鎖合成反応が行われた時には、前述の反応により発光し、実施例 1、2 と同様にして光検出器により検出される。なお、上部板 1 4 には、加圧を行うために各試薬溜に通じる穴が形成されている。また、反応を均一にするために反応モジュールを振動させる振動子 3 2 を取り付けられている。

## 【 0 0 4 0 】

キャピラリーは細溝 1 3 として構成したが、反応槽の底面に垂直方向に毛細管を設けてここから試薬を供給してもよい。この実施例は多数の反応槽をもうけたモジュールに有効である。

## 【 0 0 4 1 】

図 8 は、本発明の実施例 3 の他の構成例を示す図であり、外部に試薬溜を持ち

、複数の反応部にマイクロ加工等により作製した溝を用いて試薬を供給する構造としDNA配列決定装置の接合型反応モジュールの構成例を示す図である。図8に示す接合型反応モジュールの例では、図7に示す接合型反応モジュールの例と同様に、反応試薬を反応槽10の下部から供給する。接合型反応モジュールは、反応槽10を構成する複数の穴が形成された接合型反応モジュールの上部板14と、各反応槽10に対応してdNTPを供給する4本の試薬導入用キャピラリー13が埋め込まれた接合型反応モジュールの中板16と、4本の試薬導入用キャピラリー13に対応して4本の試薬導入用の溝6'が形成された接合型反応モジュールの下部板17とが接合されて形成され、上部板14と中板16の接合により多数の相互に分離された反応槽10が形成される。各反応槽に対応する4本の試薬導入用の溝6'と試薬溜1、2、3、4とは試薬導入用細管6により結ばれており、各反応槽に試薬がキャピラリー13から供給される。図8に示す反応モジュールの構成では、洗浄も容易であり繰り返し使用できる。4種のdNTPはそれぞれ独立の試薬溜1、2、3、4に保持され、加圧により細管6、溝6'、キャピラリー13を経由して各反応槽10へ順番に供給される。溝6'と反応部10はキャピラリー13で結ばれているがキャピラリー13の内径は細管6より細く、加圧時の圧力損失はほぼキャピラリー13の部分でおこる。DNA相補鎖合成反応が行われた時には、前述の反応により発光し、実施例1、2と同様にして光検出器により検出される。図8に示す反応モジュールの例では、反応部を6個示したが96穴のタイタープレートの穴のピッチと同じピッチで反応部を作製した反応モジュール等も可能である。

#### 【0042】

以上説明した実施例1～実施例3では、試料は予め1本鎖状態に調製されたDNAをプライマー、ポリメラーゼ及び他の試薬とともに試料毎ごとに異なる反応セル（反応槽）に入れ、パイロシーケンシングの所定の反応を行い配列を決定した。

#### 【0043】

##### （実施例4）

配列決定すべき試料としては、複数種のDNA試料を含む場合、1つのDNA

に複数の配列解析すべき場所がある場合、および配列解析を段階的に繰り返して行う場合等が含まれる。実施例 4 は、配列決定部位が複数ある場合の効率のよい DNA 試料供給に関する（図 6 ～ 図 1 0 参照）。ここでは多数サンプルを効率よく配列決定する例を示す。配列決定するターゲット毎に異なるプライマーを用いる。各プライマーをペレット、ビーズ等の固体表面に固定し、区分けされた固体表面上あるいはそれぞれ異なるビーズ表面に固定し、空間的に識別できる配置で反応セル（反応部、反応槽）内に保持する。次いで DNA サンプルを反応部に入れて固定されたプライマーとハイブリダイゼーションさせ、所定の配列を持つ DNA を捕獲する。残りの DNA を含む溶液を排出除去した後、反応液を注入してパイロシーケンシングを先に説明した手順に従って行う。発光は位置検出可能な CCD アレーセンサーあるいは検出位置をずらすことのできる共焦点顕微鏡技術を応用した検出器等で発光位置を識別し、どの DNA からの相補鎖合成産物が光っているか識別できる構成とする。

## 【 0 0 4 4 】

## （実施例 5）

実施例 5 は、反応にアピラーゼ等の d N T P 分解酵素を用いない方式を実現した例である。DNA をビーズに固定し、キャピラリー等からなる反応セルに入れる。反応セルは分光セルのような角型のものでもよい。複数の DNA 配列を同時に配列決定するときには配列決定しようとする DNA が区別できるように、DNA を固定したビーズを区分けして保持したり、異なるセルに保持したりする。

## 【 0 0 4 5 】

図 9 は、本発明の実施例 5 の構成例を示す図であり、DNA およびプライマーをキャピラリー中にあるビーズ上に保持し、キャピラリー内に試薬を流すことにより相補鎖合成を段階的に行う DNA 配列決定装置の構成例を示す図である。キャピラリー型の反応部 2 0 の内部に、プローブおよび DNA を保持したビーズ 2 3 を並べるが、種類の異なる DNA を保持したビーズ 2 3 の間に分離用ビーズ 2 2 がおかれており、反応生成物が混合しないように工夫されている。分離用ビーズ 2 2 の直径はキャピラリー型反応部 2 0 の内径よりやや小さく、ビーズ 2 3 の直径は分離用ビーズ 2 2 の直径よりも小さく、キャピラリー 2 0 の内部に反応液

や洗浄液が流入しても、分離用ビーズ 2 2 の間からビーズ 2 3 が抜け出すことはない。なお、キャピラリー型反応部 2 0 内の試薬および洗浄液流入口 2 6 および溶液出口 2 7 の側にはそれぞれ、分離用ビーズ 2 2 の移動を妨げるストッパーが形成されている。このような配置に分離用ビーズ 2 2、プローブおよび DNA を保持したビーズ 2 3 を並べた後、反応試薬を含む溶液を試薬溜 1、2、3、4 の何れかから、試薬および洗浄液流入口 2 6 から反応部 2 0 に注入する。4 種の d N T P を繰り返し順番に注入するが、1 つの d N T P の注入と反応の終了後には、導入管接合部 1 9 を切り替えて洗浄液溜 1 8 から洗浄液を試薬および洗浄液流入口 2 6 から反応部 2 0 に流して反応液を溶液出口 2 7 から廃液入れ 2 1 に除去し、次の d N T P を入れる。キャピラリー型反応部 2 0 としては内径 0. 1 mm ～ 0. 3 mm 程度のものが用いられるが、反応に要する液量は高々数マイクロリッターであり、1 0 0 回繰り返し反応しても消耗する試薬量は従来の方法に比べると非常に少なく、ほとんど無視し得る量である。

## 【 0 0 4 6 】

1 つの d N T P の注入により DNA 相補鎖合成反応が行われた時には、前述の反応により、DNA 相補鎖合成反応が生成したビーズ 2 3 の近傍で発光し、図 9 に示す例では、発光は冷却 CCD カメラ 2 4 により検出され、実施例 1、2 と同様にして、検出された発光信号はデータ処理器 2 5 で処理され塩基配列が決定されていく。

## 【 0 0 4 7 】

以上の説明では、キャピラリー型反応部 2 0 を用いて複数の DNA 配列を同時に配列決定する構成例について説明したが、複数の分画（セル）が形成された基板型の反応部を使用して、プローブおよび DNA を保持したビーズ 2 3 を各分画（セル）に保持して複数の DNA 配列を同時に配列決定することもできる。基板型の反応部の複数の分画（セル）に、4 種の d N T P を繰り返し順番に注入し、1 つの d N T P の注入と反応の終了後に、各分画（セル）に洗浄液を流して反応液を除去し、次の d N T P を入れる。1 つの d N T P の注入により DNA 相補鎖合成反応が行われた時には、前述の反応により、DNA 相補鎖合成反応が生成した分画（セル）で発光が生じるので、発光を検出する。



【 0 0 4 8 】

図 1 0 は、本発明の実施例 5 の他の構成例を示す図であり、基板に設けた穴にビーズを保持し、ビーズに捕獲された DNA およびプライマーを用いて相補鎖合成し、ルシフェラーゼ等を使用して発光を検出する DNA 配列決定装置に使用する接合型反応モジュールの構成例を示す図である。図 1 0 に示す接合型反応モジュールは、反応槽（セル）2 8 を構成する複数の穴、試薬および洗浄液流入口 2 6、溶液出口 2 7 が形成された接合型反応モジュールの上部基板 3 1 と、反応液流路（溝）2 9 が形成された接合型反応モジュールの下部基板 3 0 とを接合して形成される。上部基板 3 1 と下部基板 3 0 とを接合したとき、反応液流路 2 9 は全ての反応槽（セル）2 8 に接続する。図 1 0 に示したように全ての反応槽（セル）2 8 に共通した反応液流路 2 9 を作ることが簡便な反応デバイスのキーポイントである。図 1 0 に示す構成では、異なる DNA 配列決定をセル毎に行うが反応液の供給と排出は同時に一緒に行える様に下部基板に反応液流路 2 9 が設けてある。反応液流路 2 9 の深さはビーズ 2 3 の直径の値より小さくする。DNA およびプライマーを保持したビーズ 2 3 は反応槽 2 8 から出ることができないが、反応液は反応液流路 2 9 を通して注入・排出が簡単にできる。ビーズに固定された DNA はここでは配列解析しようとする DNA を固定したが、ルシフェラーゼ等の酵素も併せてビーズに固定したり、異なるビーズあるいは反応セル壁面に固定してもよい。図 1 0 に図示しないが、図 9 の構成と同様に、溶液出口 2 7 は廃液入れ 2 1 につながり、試薬および洗浄液流入口 2 6 は導入管接合部 1 9 を介して、反応試薬を含む溶液を試薬溜 1、2、3、4、洗浄液溜 1 8 につながっている。試薬溜からの試薬の流入後、フローを止めて相補鎖合成反応を行う。フロー中に起こる相補鎖合成反応を抑えるために、フロー中は反応部を 2 0 ° C に冷却し、反応時に適温となるように温度コントロールする事も配列決定ミスを防ぐのに有効である。キャピラリー型の反応部の場合と同様に、d N T P および種々反応試薬の混ざった反応液を順次注入し相補鎖合成し、反応産物として放出されるピロリン酸を A T P に変換しルシフェリンを光らせてこの発光を光検出器で検出する。下部基板 3 0 を透明な材質で構成する場合には、下部基板 3 0 の底面側から発光を検出する。また、セル 2 8 の開口部側から発光を検出してもよい。この

検出の後に反応液の排出と新たな d N T P の注入という動作を繰り返して D N A 塩基配列を決定する。図 1 0 に示す構成では液体の流れ方向を接合型反応モジュールの下部基板 3 0 の底面に平行な方向としたが、底面側あるいは上面側から反応液を出し入れしてもよい。この場合、底面は穴付きの部材で構成し、ビーズは通らないが液体は通過する構成とする。

#### 【 0 0 4 9 】

#### 【発明の効果】

以上述べたように本発明によれば、毛細管あるいは細溝を用いることにより、コンパクトで安価な D N A 配列決定装置を作成する事ができる。また、D N A あるいはプライマーをビーズ等の固体表面に固定して相補鎖合成を行い、生成物のピロリン酸を A T P に変え、ルシフェリンを光らす様にしてその発光位置をモニターすることで非常に多くの D N A サンプルを同時に簡単に配列決定する事ができる。一方、反応槽をキャピラリーあるいは分光セルの様なもので構成し、反応液を注入あるいは排出しうる構造とすることで d N T P を分解する酵素を使用せずに反応を行なうことができる。この場合、相補鎖合成反応は十分に行えるので反応が十分に行われないことによる配列決定のミスを低減することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

本発明の実施例 1 の構成例を示す図であり、1 つの反応部と d N T P 試薬溜を持つ D N A 塩基配列決定装置の構成例を示す模式図。

#### 【図 2】

本発明の実施例 1 の他の構成例を示す図であり、複数の反応部を持ち、外部に設けられた試薬溜と複数の反応部を配管で結合した反応モジュールの構成例を示す模式図。

#### 【図 3】

本発明の実施例 1 のパイロシーケンシングで行われる一連の反応を示す図。

#### 【図 4】

本発明の実施例 1 の構成により実験で得られる発光信号の例を示し、縦軸は発光強度、横軸は時間を示す図。

【図 5】

本発明の実施例 2 の構成例を示す図であり、反応部に上部からキャピラリーで d N T P を注入するタイプのパイロシーケンシングデバイス（DNA 塩基配列決定装置）の構成例を示す図。

【図 6】

本発明の実施例 2 の他の構成例を示す図であり、複数の反応部をもち、外部に配置された試薬溜の d N T P を配管を通して上部からキャピラリーにより順番に 4 種の d N T P を注入する反応モジュールの構成例を示す図。

【図 7】

本発明の実施例 3 の構成例を示す図であり、複数の反応部と試薬溜を持ち、細管を用いて試薬を反応部に供給する構造の反応モジュールの構成例を示す図。

【図 8】

本発明の実施例 3 の他の構成例を示す図であり、外部に試薬溜を持ち、複数の反応部に溝を用いて試薬を供給する構造の反応モジュールの構成例を示す図。

【図 9】

本発明の実施例 5 の構成例を示す図であり、DNA およびプライマーをキャピラリー内のビーズに保持し、キャピラリー内に試薬を流すことにより相補鎖合成を段階的に行う DNA 配列決定装置の構成例を示す図。

【図 1 0】

本発明の実施例 5 の他の構成例を示す図であり、DNA およびプライマーを保持したビーズを基板に設けた穴に保持し、相補鎖合成を行う接合型反応モジュールの構成例を示す図。

【符号の説明】

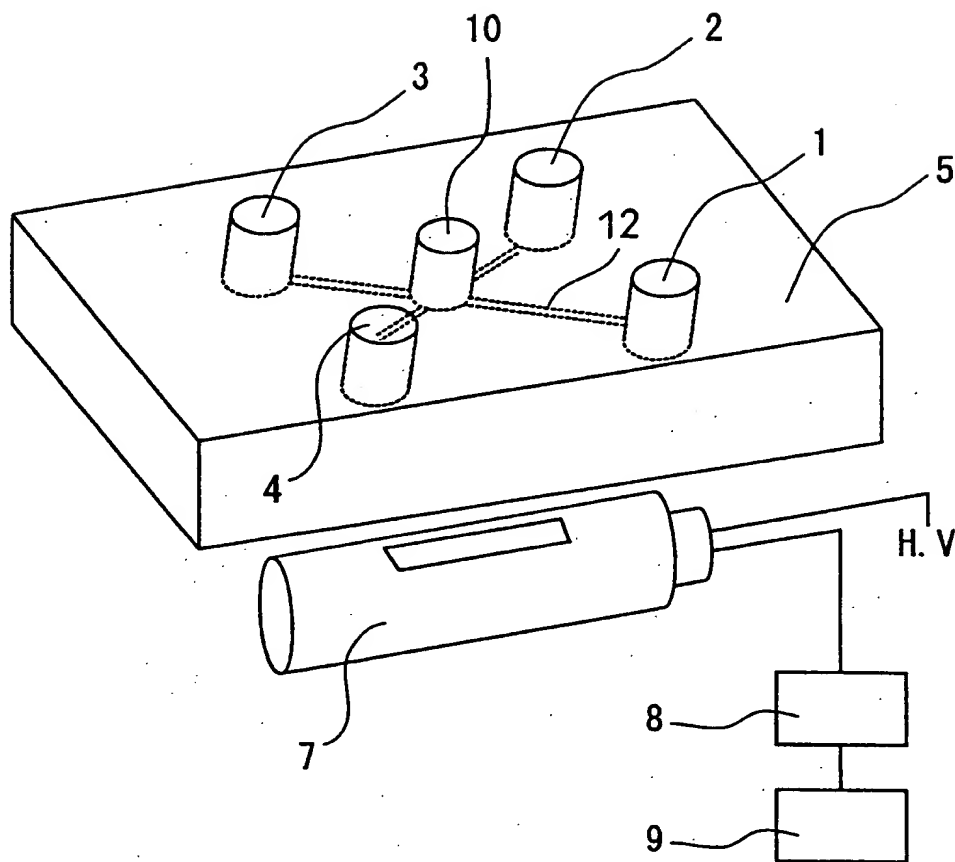
1、2、3、4 … d N T P 等の試薬溜、5 … デバイス基板、5' … マイクロタイタープレート、6 … 試薬導入用細管、6' … 試薬導入用の溝、7 … 2 次電子増倍管、8 … 増幅器、9 … データ処理器、1 0 … 反応槽、1 1 … 試薬導入用細管とキャピラリーを具備したふた、1 2 … 試薬導入用キャピラリー、

1 3 … 試薬導入用キャピラリー、1 4 … 接合型反応モジュールの上部板、1 5 … 接合型反応モジュールの下部板、

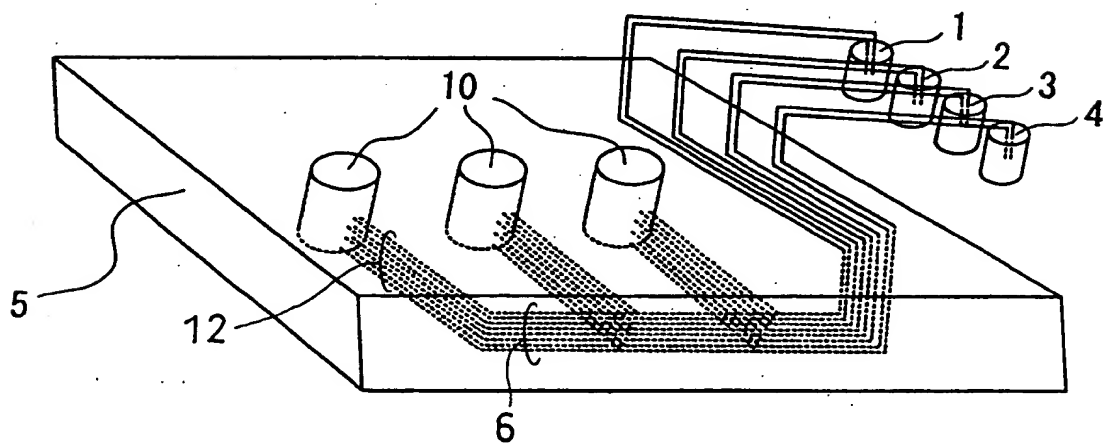
1 6 …接合型反応モジュールの中板、1 7 …接合型反応モジュールの下部板、  
1 8 : 洗浄液溜、1 9 …導入管接合部、2 0 …キャピラリー型の反応モジュール、  
2 1 …廃液入れ、2 2 …分離用ビーズ、2 3 …プローブおよびDNAを保持したビーズ、  
2 4 …冷却CCDカメラ、2 5 …データ処理器、  
2 6 …試薬および洗浄液流入口、2 7 …溶液出口、2 8 …反応槽、2 9 …反応液流路、  
3 0 …接合型反応モジュールの下部基板、3 1 …接合型反応モジュールの上部基板、  
3 2 …振動子

【書類名】 図面

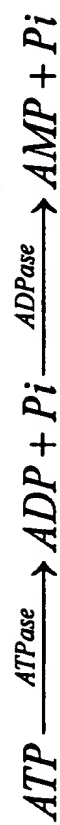
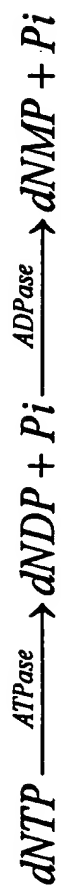
【図 1】



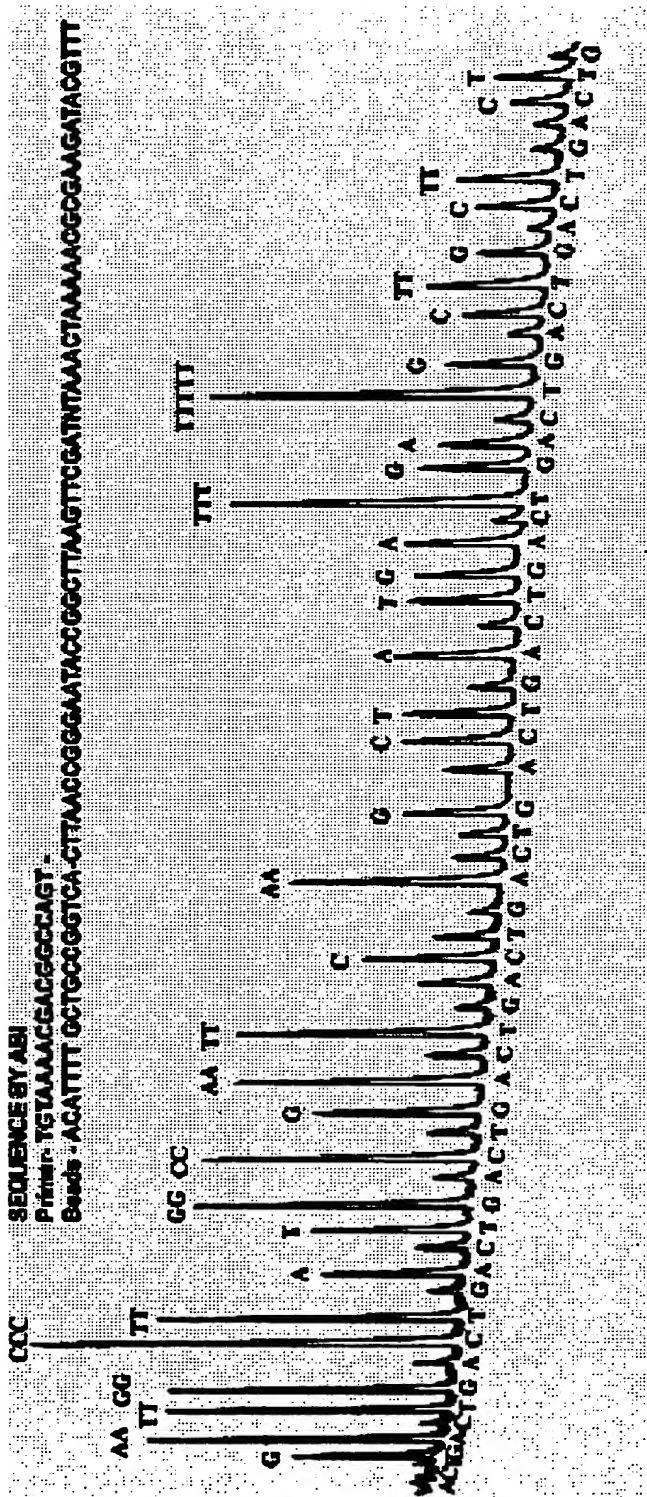
【図 2】



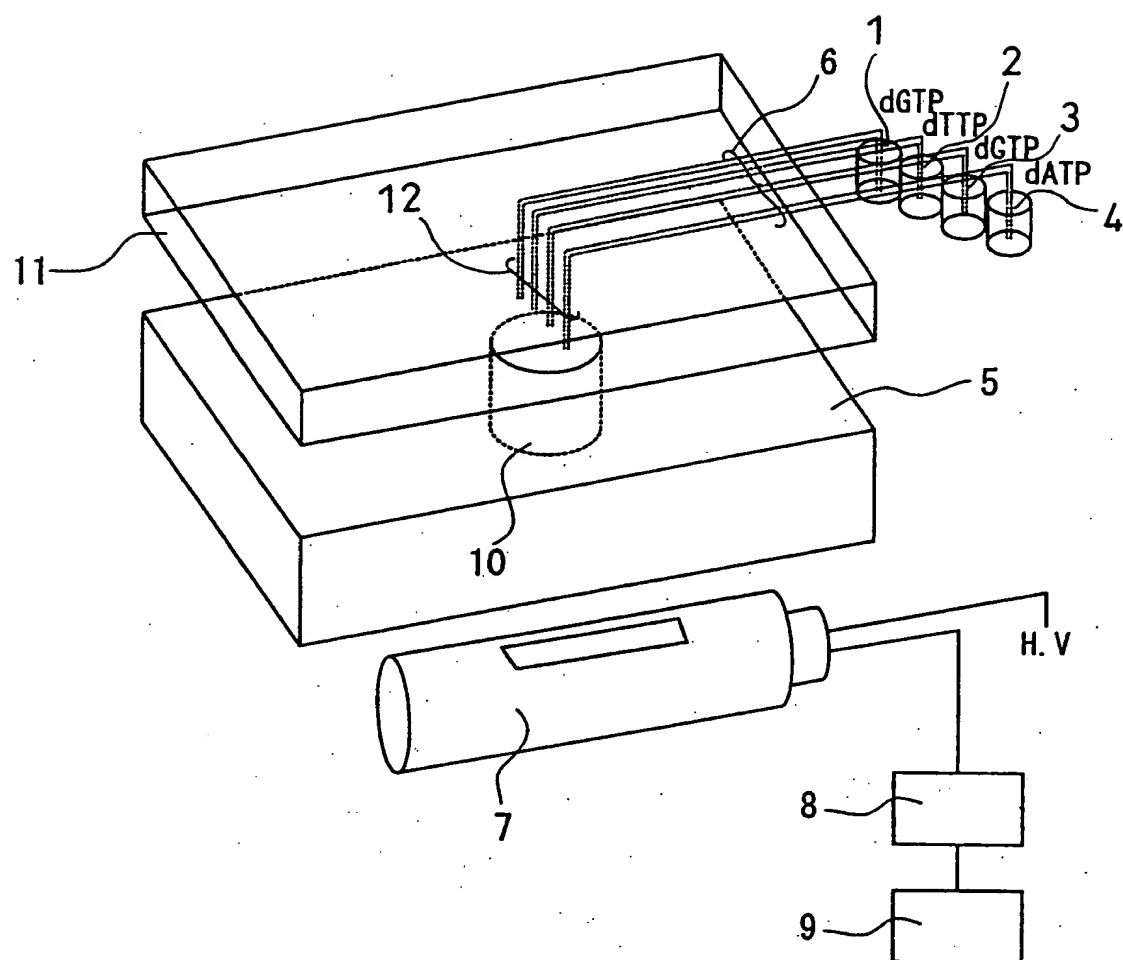
【図 3】



【図 4】

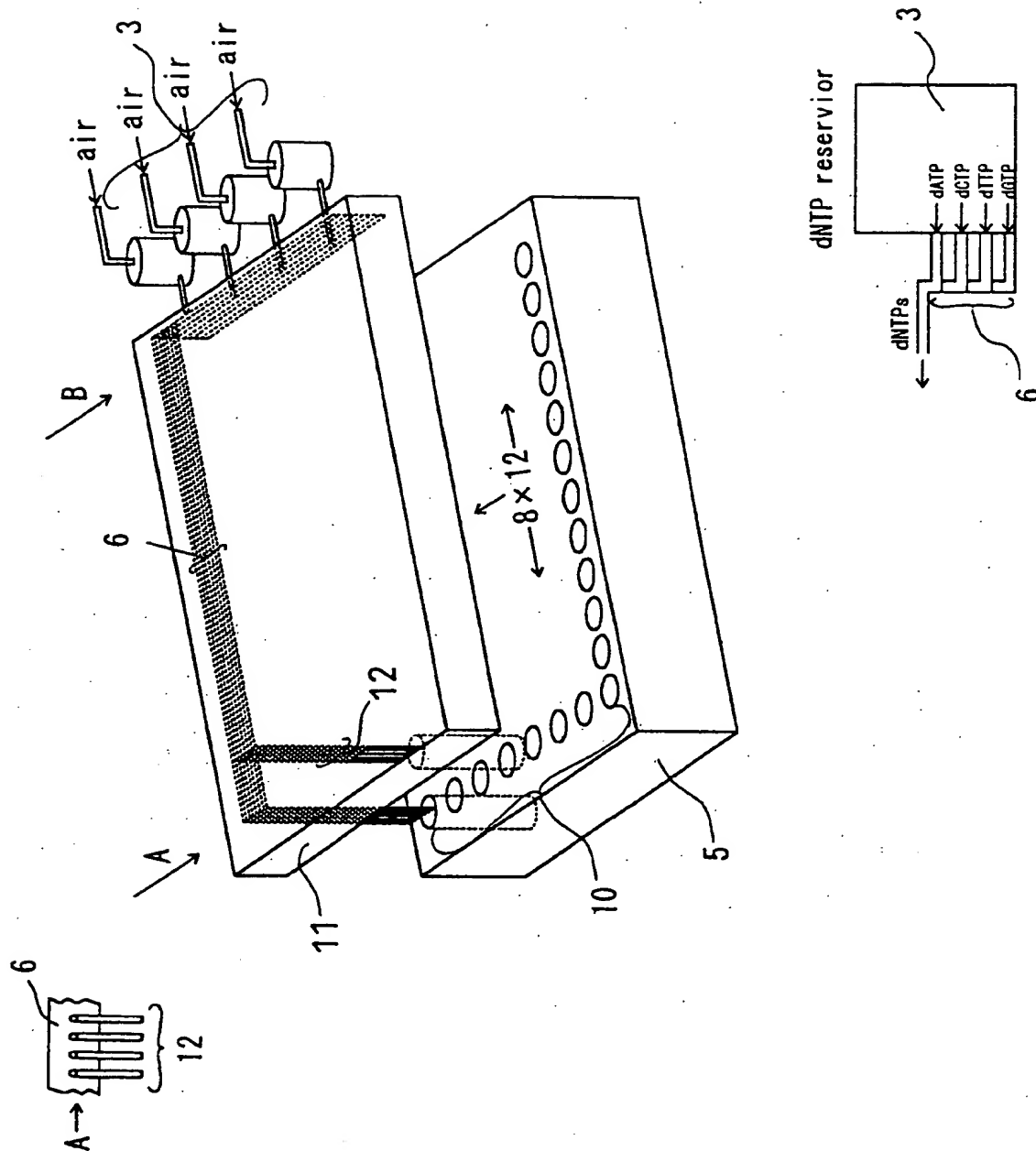


【図 5】

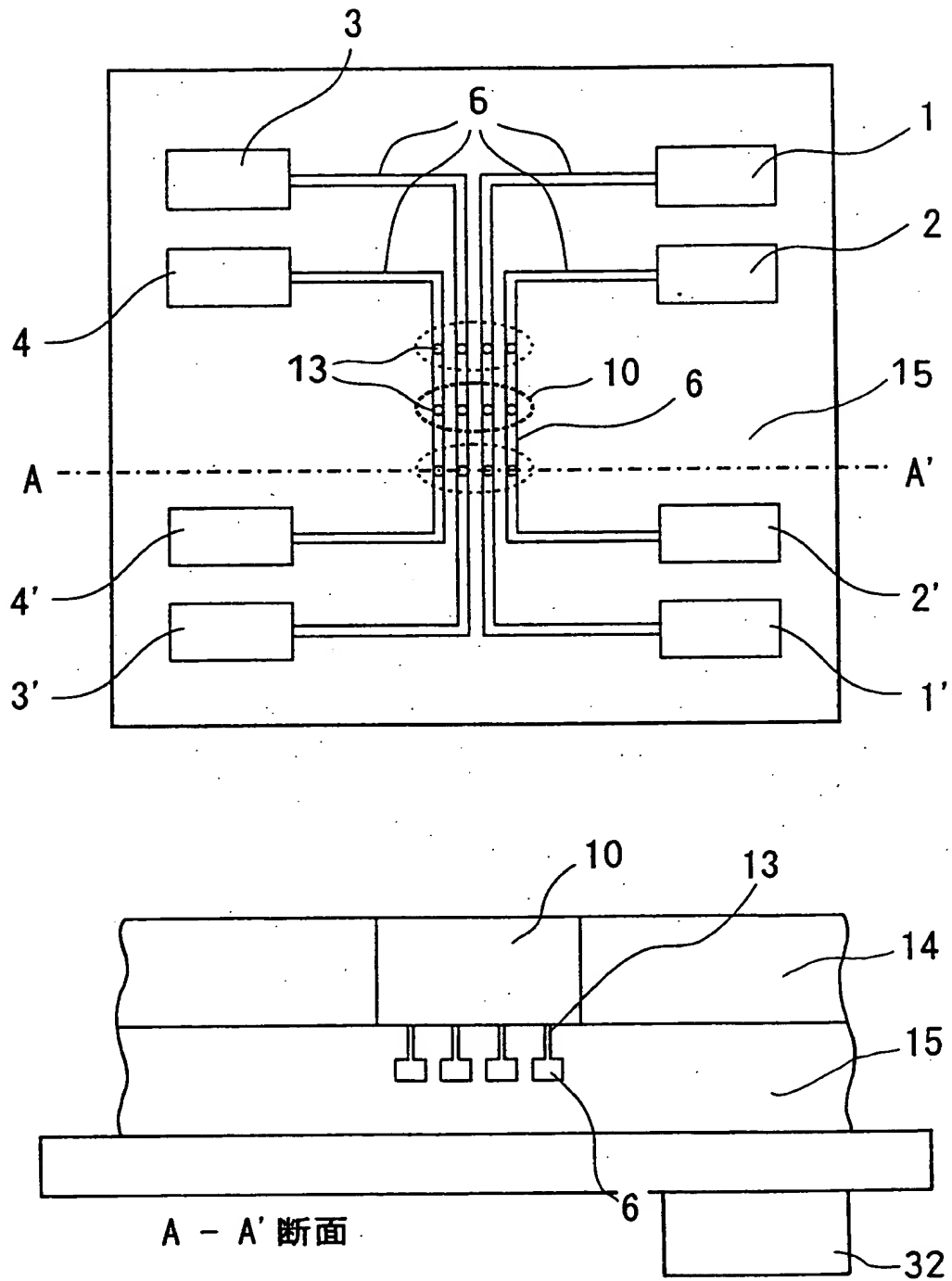




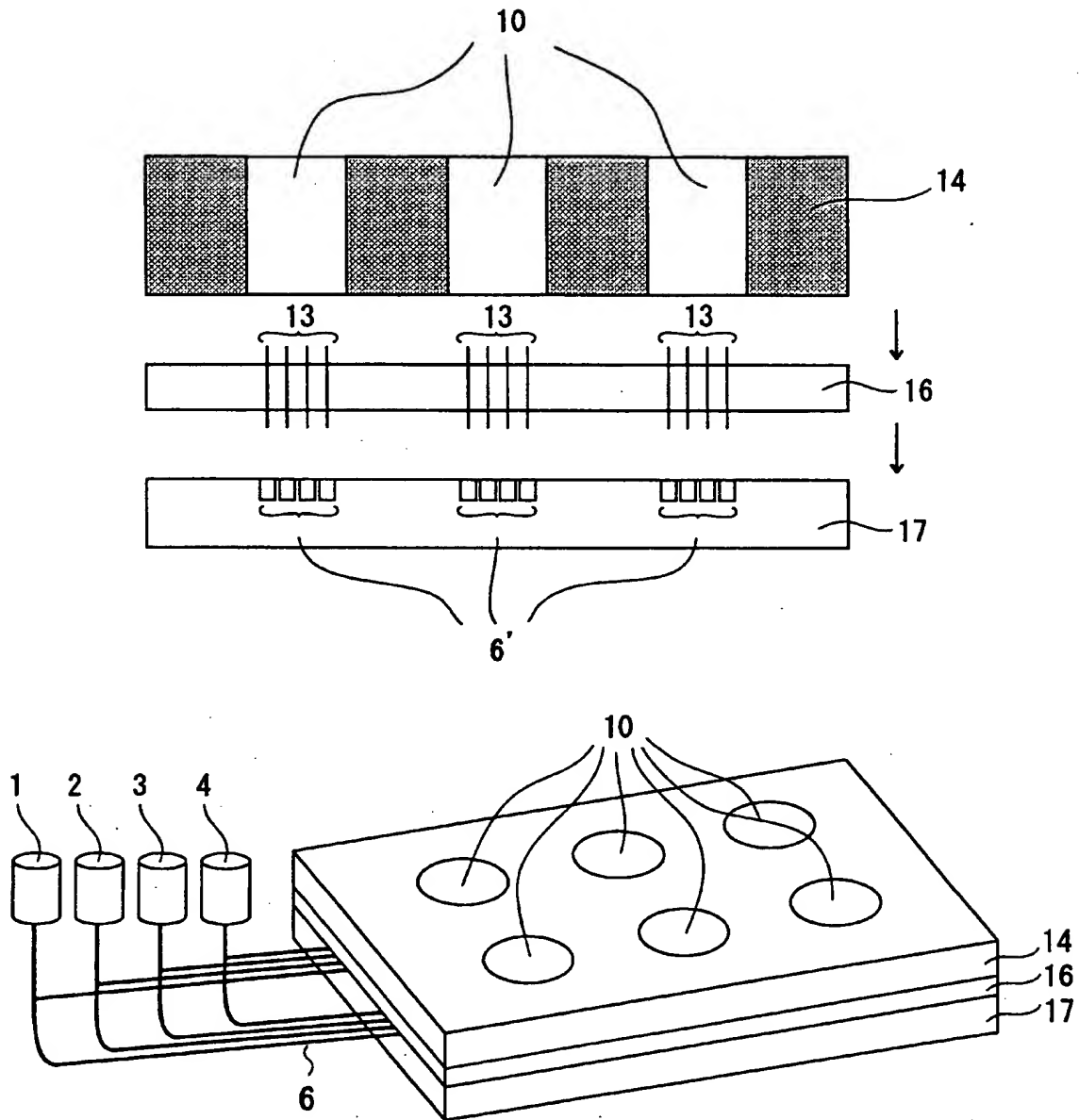
【図 6】



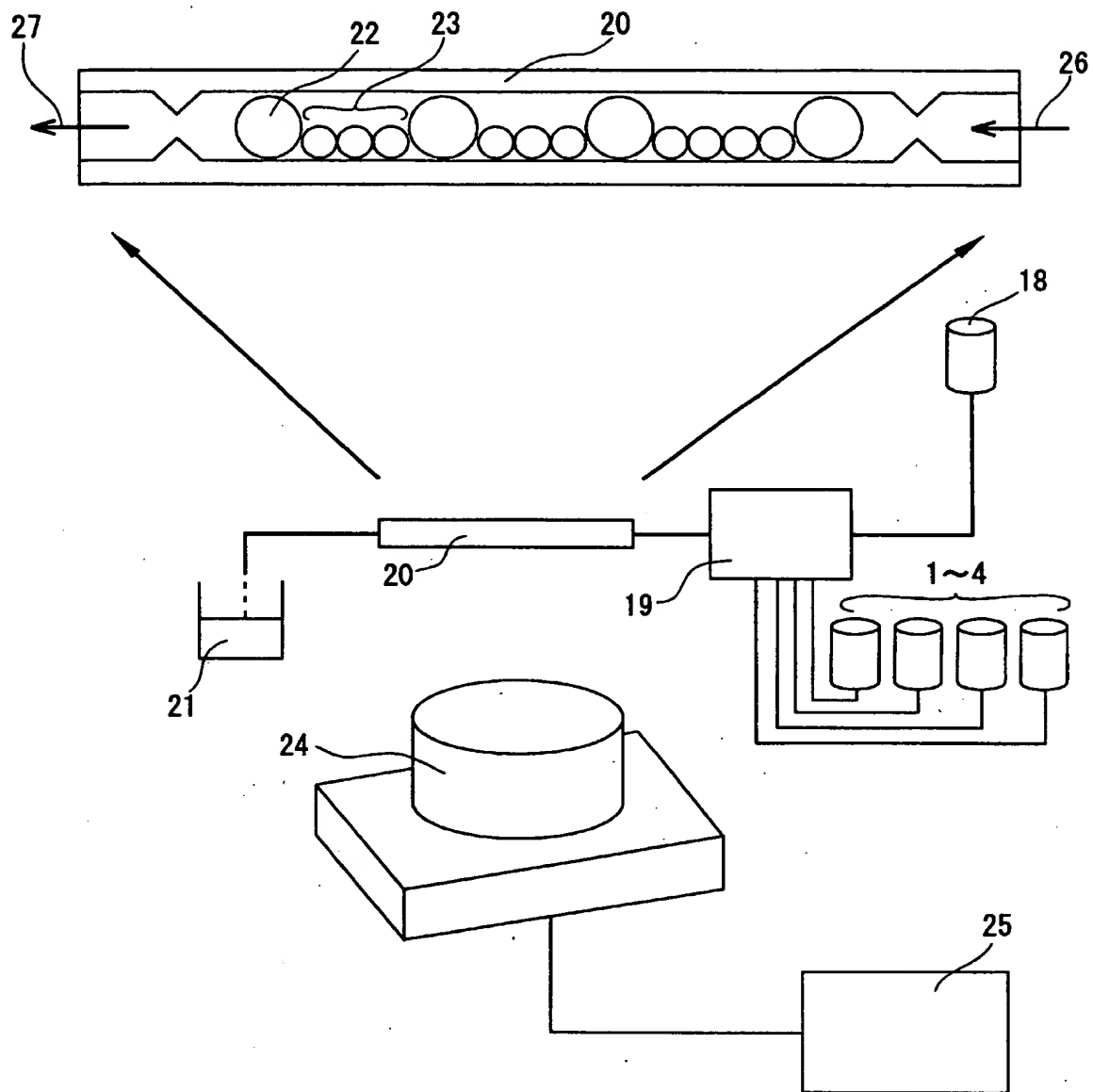
【図 7】



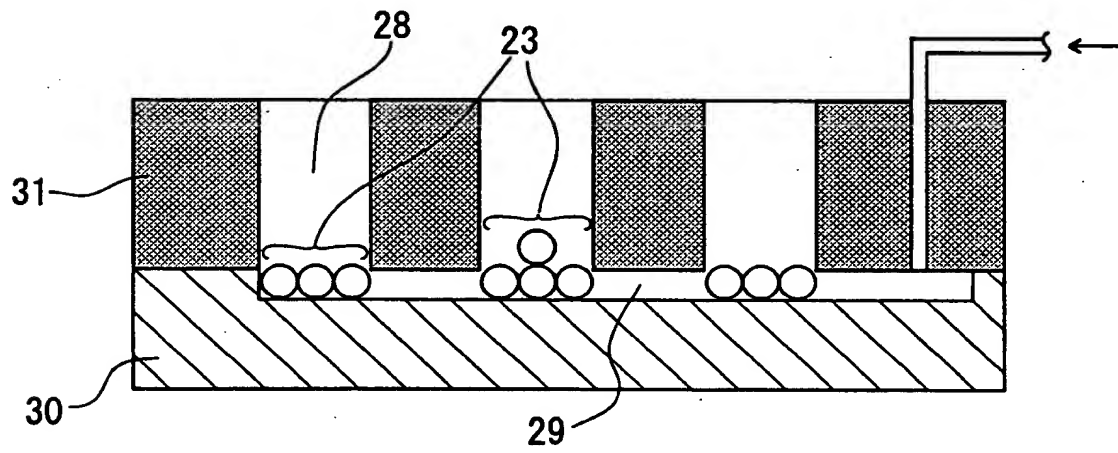
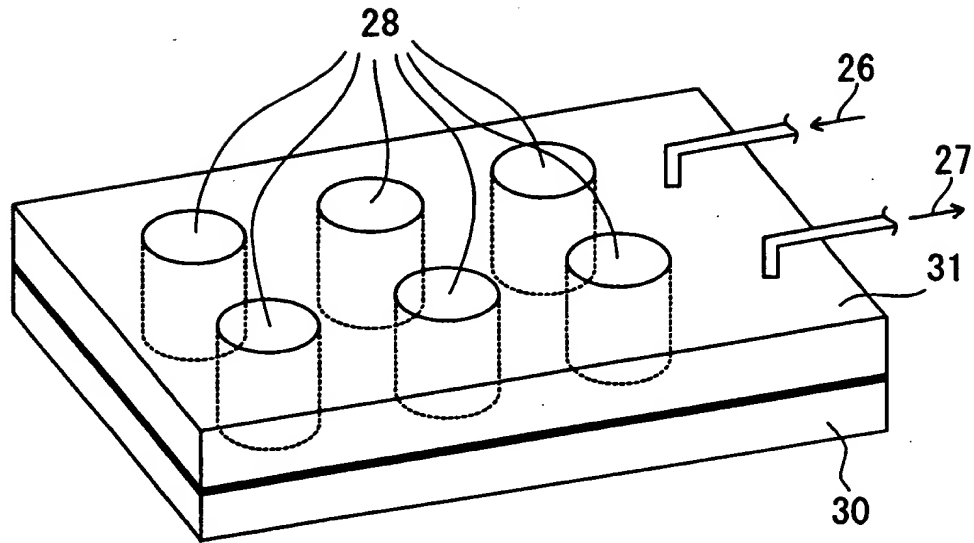
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 小型で簡便な構成のDNA塩基配列決定装置を提供する。

【解決手段】 複数の反応部（反応槽）10と試薬導入細管6が一体にデバイス基板5に形成されたパイロシーケンシングのための反応モジュールと分離された試薬溜1、2、3、4に試薬が保持され、試薬導入細管（毛細管）6を通して各反応部10に試薬が導入される。試薬導入細管（毛細管）6の各反応部に接する2cmの領域が約0.1mm内径の細い毛細管（キャピラリー）で構成されており、ここを通過する液体抵抗が注入スピードを決める。

【効果】 多種類DNAの同時解析が可能となる。

【選択図】 図2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日	1990年 8月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名	株式会社日立製作所